

Efecto de mercurio sobre el transporte celular del agua en plantas. Una revisión

Effect of mercury on cellular transport of water in plants. A review

JULIÁN FERNANDO CÁRDENAS-HERNÁNDEZ^{1,3}
LIZ PATRICIA MORENO F.²
STANISLAV V. MAGNITSKIY²

El mercurio interviene en el estado hídrico de las plantas vía foliar.

Foto: G. Fischer



RESUMEN

Los metales pesados (MP) pueden afectar las relaciones hídricas de la planta de muchas formas. El Hg inhibe la actividad de las acuaporinas, proteínas que forman los canales transportadores de agua, y de esta manera afecta la conductividad a nivel celular y de tejidos en zonas específicas de la raíz, así como el volumen de las células guarda modificando los movimientos estomáticos. Además, junto con otros metales pesados, el Hg produce cambios morfológicos como el acortamiento o modificación en la elasticidad de las raíces, disminuyendo el área efectiva para la toma de agua. En hojas, el cambio en el número de estomas y de tricomas causado por el Hg, altera la tasa de transpiración. En este artículo se revisa el efecto del Hg sobre el transporte de agua en la planta a nivel celular y su relación con el estatus hídrico de ésta. Además, se presentan avances recientes en el conocimiento de las acuaporinas basados en la utilización del Hg como inhibidor de su actividad.

Palabras clave adicionales: acuaporinas, conductividad hidráulica, raíces, estomas.

¹ Programa de Maestría en Ciencias Agrarias, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia).

² Departamento de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia).

³ Autor para correspondencia. jfcardenash@unal.edu.co

ABSTRACT

Heavy metals could affect hydric relationships in plants in many ways. Mercury inhibits activity of aquaporins, the proteins that form the channels-transporters of water and, thus, affects water conductivity of cells and tissues of special root zones as well as volume of guard cells modifying stomatal movements. Mercury produces morphological changes in plants, the effects typical for other heavy metals, such as shortening of root or decrease in root elasticity, thus reducing effective area for water absorption. In leaves, the changes in number of stomata and trichomes caused by the effects of Hg alter the transpiration rates. In the present article, the effects of Hg over the water transport in plants at cellular level and whole hydric status of plants are revised. Additionally, the recent studies on aquaporin functioning are discussed, with Hg used as an agent to inhibit aquaporin activity.

Additional key words: aquaporins, hydraulic conductivity, roots, stomata.

Fecha de recepción: 02-09-2009

Aprobado para publicación: 30-11-2009

INTRODUCCIÓN

Las plantas necesitan elementos esenciales para completar su ciclo de vida. Algunos de estos elementos son requeridos en concentraciones altas y son conocidos como macronutrientes, sin embargo, otros como el hierro, manganeso, molibdeno, cobre, zinc y níquel, llamados micronutrientes, son requeridos en cantidades mínimas (Arnon y Stout, 1939). Además las plantas absorben elementos que no tienen una función fisiológica conocida y que incluso son tóxicos en bajas concentraciones, tales como, el cromo, el mercurio y el plomo, conocidos como metales pesados (MP) (Mendelsohn *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2004; Burzynski y Zurek, 2007). Estos elementos alteran los procesos fisiológicos de la planta y pueden tener un efecto negativo en su crecimiento y desarrollo aunque también los elementos esenciales, especialmente los micronutrientes, pueden convertirse en tóxicos cuando se absorben sobre ciertos valores límite (Peralta-Videa *et al.*, 2009). En Colombia, la contaminación del agua de riego con MP representa un problema importante, no solo por sus

efectos visibles sobre plantas cultivadas, sino por sus efectos sobre la salud de los consumidores de dichos productos (Miranda *et al.*, 2008).

Los MP, incluido el mercurio (Hg), disminuyen la tasa de crecimiento de las plantas debido a que afectan varios procesos del metabolismo radicular, causando inhibición de la toma de agua y nutrientes (Tamás *et al.*, 2008), alteración del funcionamiento de las membranas (Hernández y Cooke, 1997), inhibición de la actividad enzimática (Tamás *et al.*, 2006), oxidación y unión entre proteínas (Ortega-Villasante *et al.*, 2005), inhibición de la división celular (Fusconi *et al.*, 2006) y muerte celular (Ortega-Villasante *et al.*, 2005). Estos efectos, producto de la toxicidad por MP, están asociados al estrés oxidativo producido por estos, tanto en raíces como en hojas (Ortega-Villasante *et al.*, 2005; Romero-Puertas *et al.*, 2004) que además causa la producción de peróxido de hidrógeno y un aumento del nivel de peroxidación de lípidos (Cho y Park, 2000; Dixit *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2006).

Además de los efectos directos de los iones metálicos sobre la fisiología de la planta, su presencia puede volverla más susceptible a estreses como el déficit hídrico, debido a una menor capacidad de absorción de agua dada por una disminución en el desarrollo y funcionamiento del sistema radicular y posiblemente a un bloqueo de los canales de agua, esto va a causar una menor eficiencia en el uso del agua por parte de la planta (Yang *et al.*, 2004; Ionenko *et al.*, 2006; Ryser y Emerson, 2007). Los efectos de los MP y especialmente del Hg sobre los procesos fisiológicos que determinan la regulación hídrica de la planta han sido observados frecuentemente (Poschenrieder y Barceló, 2004; Santalá y Ryser, 2009).

En numerosos estudios se ha reportado el marchitamiento de las plantas como consecuencia de la toxicidad por MP y por esto ha sido ampliamente investigado el efecto de estos elementos sobre las pérdidas de agua y el comportamiento estomático de diferentes plantas (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002; Gupta y Sinha, 2009). El efecto de las concentraciones de metales pesados entre 0,2 y 1 mM sobre el movimiento de los estomas y el mecanismo como este puede darse es aún objeto de investigación (Yang *et al.*, 2004).

Es probable que metales pesados como Hg afecten los movimientos estomáticos por la inhibición de los canales de agua y limiten el flujo de esta dentro de las células guarda (Singh y Sinha, 2004). Una red de canales iónicos, la cual puede controlar el movimiento de los estomas, ha sido bien caracterizada en las membranas plasmática y vacuolar de las células guarda (Allen *et al.*, 2001; Schroeder *et al.*, 2001 y Zhang *et al.*, 2001). En el plasmalema y el tonoplasto de las células guarda se han encontrado canales de agua, los cuales permiten de forma rápida y específica su transporte. Ciertas concentraciones de magnesio y calcio inhiben los canales de agua y esto ocasiona cambios en los movimientos estomáticos (Gerbeau *et al.*, 2002). El Hg produce el mismo efecto, lo cual comprueba la participación de los canales de agua en el movimiento estomático

y su inhibición por este elemento (Yang *et al.*, 2002). Se ha encontrado que el HgCl_2 puede inhibir los canales de agua en la planta para regular el transporte de agua (Clarkson *et al.*, 2000). En el presente artículo se presenta información reciente sobre el efecto del Hg en la función de las acuaporinas en las plantas y en la conductividad hidráulica en la raíz y las hojas con el fin de dilucidar algunos aspectos relacionados con el efecto del Hg en el estatus hídrico de las plantas.

Acuaporinas y su papel en el transporte de agua en las plantas

Las acuaporinas son proteínas de las membranas intracelulares y plasmáticas que se encuentran dentro del grupo de las denominadas proteínas intrínsecas mayores, las cuales están encargadas de facilitar el transporte de agua a través de membranas biológicas en todo tipo de organismos como bacterias, animales y plantas (Zhang *et al.*, 2008). Las acuaporinas son vías proteicas transmembranales no solo para el agua (Quigley *et al.*, 2001), sino para algunos pequeños solutos sin carga (Gerbeau *et al.*, 1999), CO_2 (Endevard *et al.*, 2006) y ácido bórico (Maurel *et al.*, 2008).

El descubrimiento de las acuaporinas se dio en 1988 cuando Peter Agre y su equipo, de la Universidad Johns Hopkins, estudiaban las proteínas de la membrana de los eritrocitos. Durante sus trabajos de purificación de la proteína de 32 kilodalton que determina el grupo sanguíneo Rh, encontraron un polipéptido de peso molecular inferior (28 kDa) que copurificaba con la proteína de interés. Después de continuar con las investigaciones encontraron que se trataba de una nueva proteína integral de membrana. Inicialmente la denominaron CHIP28, posteriormente recibiría el nombre de AQP1, la función de esta proteína fue determinada hasta 1992 (Echeverría y Zardoya, 2006).

Los investigadores hallaron que algunas células animales inyectadas con cantidades pequeñas de ARN mensajero de AQP1 desarrollaban

una permeabilidad al agua superior a las células control sin inyectar o inyectadas con agua. Se descubrió también que la permeabilidad al agua dependiente de AQP1 se inhibía con cloruro de mercurio y que tal efecto se revertía con agentes reductores (Echeverría y Zardoya, 2006). Este comportamiento correspondía a un flujo de agua mediado por canales, lo que significaba que habían descubierto una proteína que funcionaba como un canal de agua. Este descubrimiento ha permitido explicar mejor algunos procesos celulares y características de tejidos en animales y plantas (Echeverría y Zardoya, 2006).

Las acuaporinas en las plantas han sido clasificadas en cuatro grandes grupos: proteínas intrínsecas de la membrana plasmática (PIP) con dos subgrupos filogenéticos PIP1 y PIP2; proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIP); nodulinas intrínsecas (NIP) donde NOD26 es una acuaporina descubierta en la membrana peribacterial de las raíces noduladas de soya; y pequeñas proteínas básicas intrínsecas (SIP) que se han observado en la membrana del retículo endoplasmático (Ishikawa *et al.*, 2005).

La primera evidencia del papel de las acuaporinas en la toma de agua a nivel celular y en el transporte de esta en toda la planta surgió de plantas transgénicas antisentido para PIP, las cuales desarrollaron un sistema radicular más grande que las plantas control (Kaldenhoff *et al.*, 1998). En tabaco, la acuaporina de la membrana plasmática NtAQP1 mostró ser importante para la conductividad hidráulica y la resistencia al estrés hídrico (Siefritz *et al.*, 2002). Los estudios en plantas con producción desigual de P1P1 y P1P2 indicaron que ambas acuaporinas son necesarias para la recuperación del déficit hídrico (Martre *et al.*, 2002). Las acuaporinas no solo controlan el transporte de agua de las raíces a las hojas en la corriente transpiratoria, sino que regulan otros procesos como el transporte de asimilados en el floema, la apertura y cierre de los estomas en las hojas, el movimiento de las hojas y el control de la homeostasis citoplasmática (Chaumont *et al.*, 2005).

Existen dos vías posibles para el flujo osmótico del agua entre los tejidos de las plantas: la vía apoplástica conformada por las paredes celulares, los espacios intercelulares y el xilema y la vía simplástica conformada por el continuo citoplasmático y la vacuola (transporte a través de membranas y plasmodesmata). El agua se mueve, todo el tiempo, utilizando simultáneamente las dos vías. La vía más utilizada depende de la especie, el órgano, la condición fisiológica de la planta al igual que la fuerza conductora (hidrostática o presión osmótica). La presencia de acuaporinas en el tonoplasto aumenta la efectividad en el transporte del agua, una vez esta ha atravesado la membrana celular (Chrispeels y Maurel, 1994).

El flujo de agua a través de las células se puede modificar alterando el comportamiento individual de los canales de agua o la abundancia de los mismos en las membranas. Cuando hay poca regulación de las acuaporinas en el tonoplasto la conductividad hidráulica puede disminuir. Para aumentar la conductividad transcelular del agua, la célula puede aumentar el número de acuaporinas en el plasmalema, a través del aumento de la expresión de los genes que codifican algunas PIP, esto puede ocurrir durante el estrés por déficit hídrico (Chrispeels y Maurel, 1994).

Efecto del mercurio sobre las acuaporinas

Recientemente se han desarrollado herramientas específicas para monitorear la expresión de la familia entera de las acuaporinas. Utilizando librerías de cDNA e hibridándolas con secuencias específicas de genes de las acuaporinas se ha encontrado una regulación coordinada de estos genes en respuesta a estrés por déficit hídrico y por nutrientes (Maathuis *et al.*, 2003; Alexandersson *et al.*, 2005). Los análisis cuantitativos por RT-PCR han sido usados para establecer la abundancia de los transcritos de las acuaporinas en varios tejidos y órganos bajo diferentes condiciones de estrés (Jang *et al.*, 2004; Alexandersson *et al.*, 2005; Hachez *et al.*, 2006; Sakurai *et al.*, 2005). También se ha desarrollado un mapeo detalla-

do de la expresión celular específica de los genes de las acuaporinas en brotes de maíz y raíces de *Arabidopsis thaliana* basado en el análisis de RT-PCR *in situ* (Maurel, 2007).

El alto número de aminoácidos idénticos entre homólogos cercanos de acuaporinas (más del 97%) hace muy dispendiosa la inmunodetección específica de una simple isoforma de acuaporina. Sin embargo, anticuerpos de reacción cruzada con miembros de subclases específicas de acuaporinas de plantas han mostrado ser útiles para caracterizar la expresión en varios tipos celulares y órganos (Kobae *et al.*, 2006; Vander Willigen *et al.*, 2006). Debido a su relativa alta abundancia en las membranas de las plantas, y a su marcado carácter hidrófobo, las acuaporinas se pueden analizar fácilmente mediante espectrometría de masas (Santoni *et al.*, 2006). Esta técnica de alta resolución puede distinguir entre acuaporinas homólogas muy cercanas, razón por la cual permite realizar un seguimiento exacto de las acuaporinas presentes (Maurel, 2007).

Se ha encontrado que el transporte de Hg y otros MP está directamente relacionado con el flujo de agua en las plantas. En *A. thaliana* L. se encontró que la proteína asociada a MP (AtHMA3) pertenece al subgrupo P_{1B-2} de la familia de las ATPasas tipo P, las cuales están involucradas en el transporte de MP. Estas proteínas se encuentran localizadas en el tonoplasto con un alto nivel de expresión en células guarda, hidátodos, tejido vascular y el ápice de la raíz (Morel *et al.*, 2009).

Las acuaporinas en las células guarda pueden estar involucradas en los movimientos estomáticos (Sun *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; López-Berenguer *et al.*, 2007; Ehlert *et al.*, 2009). Varios experimentos han demostrado que los compuestos de Hg inhiben los canales de agua de las plantas a concentraciones submilimolares, pero existen algunas excepciones (Yang *et al.*, 2004). En células animales, el Hg inhibe las acuaporinas y se ha identificado el aminoácido Cys¹⁸⁹ como el sitio de inhibición del Hg de AQP1. Por otro lado

AQP4 ha sido considerada como una acuaporina insensible al Hg ya que esta no posee el residuo reactivo de cisteína correspondiente a Cys¹⁸⁹ de AQP1 (Yukutake *et al.*, 2008).

El estudio reciente de las acuaporinas ha demostrado que el Hg interfiere en la actividad de las mismas, y esto ha permitido avanzar en el estudio de su comportamiento e influencia sobre características de conductividad hidráulica y movimiento del agua (Echeverría y Zardoya, 2006).

Acuaporinas en la raíz y su efecto sobre la conductividad hidráulica

Un gran número de acuaporinas se expresan en raíces (Bramley *et al.*, 2007). Estas proteínas integrales de la membrana forman canales conductores de agua, los cuales son considerados responsables de la variación en la conductividad hidráulica en los sistemas de raíces (Javot y Maurel, 2002).

Utilizando la genética inversa se ha demostrado que las acuaporinas están relacionadas con el estatus hídrico de algunas especies durante un estrés abiótico (Yu *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2007), sin embargo, es posible que otros transportadores estén involucrados en la osmorregulación. Todo esto en conjunto puede causar cambios en la morfología del sistema radicular. Por ejemplo, la mayor masa radicular de mutantes de *A. thaliana* y *Nicotina tabacum* parece ser un efecto compensatorio de la poca expresión de las acuaporinas de la membrana plasmática que reduce la permeabilidad de algunas células (Martre *et al.*, 2002; Siefritz *et al.*, 2002; Bramley *et al.*, 2009).

Los canales de agua sensibles a Hg parecen estar involucrados en la disminución de la conductividad hidráulica desde la raíz hasta las hojas. Se ha demostrado que los iones de Hg inhiben rápidamente el transporte de agua a través de las raíces aisladas de plantas de cereales como maíz y trigo. Adicionalmente, se comprobó que la presencia de Hg en las raíces reduce la conductancia

hidráulica y además puede limitar el crecimiento de las raíces que están sometidas a estrés hídrico (Lu y Neumann, 1999).

Un estudio sobre la conductividad hidráulica de *Lupinus angustifolius* L., *Lupinus luteus* L. y *Triticum aestivum* L. demostró un papel principal de la estructura radicular y la anatomía de la raíz sobre el transporte de agua, así como la influencia de las acuaporinas. A partir de los valores de conductividad hidráulica celular alta y la fuerte inhibición por Hg se determinó que la actividad de las acuaporinas es constante en todas las células del cortex y epidermis de las tres especies (Bramley *et al.*, 2009). La conductividad hidráulica de raíces individuales y grupos de raíces de *T. aestivum* se redujo a más de la mitad después de ser tratadas con Hg. Sin embargo, a nivel celular, en *L. angustifolius* la conductividad hidráulica de las células de las raíces tratadas se redujo en 33%, en *L. luteus* en 86% y en *T. aestivum* en 77% (Bramley *et al.*, 2009).

Las capas de células más externas de las raíces de *L. angustifolius* fueron particularmente sensibles al tratamiento con Hg. Si el flujo de agua ocurre completamente a través de las células, cruzando membranas, la inhibición de la conductividad hidráulica debería reflejarse también en la conductividad de toda la raíz. Sin embargo, a nivel de sistema radicular, el control por parte de las acuaporinas del flujo del agua estuvo limitado a pequeñas regiones de la endodermis en el trigo, mientras que en lupino parece ser que el flujo del agua ocurrió predominantemente por la vía apoplastica sin ser influenciado por las acuaporinas (Bramley *et al.*, 2009).

Consistente con lo anterior, al evaluar el efecto del Hg sobre las raíces del maíz se encontró que la conductividad hidráulica celular de las células cercanas al ápice no fue afectada por el tratamiento de Hg, en contraste con las células más maduras en fase de crecimiento, donde la conductividad hidráulica se vio fuertemente reducida. A pesar que la concentración de Hg fue

relativamente baja, 20 mM de HgCl_2 , las zonas sensibles se vieron muy afectadas en la toma de agua y presentaron cambios en la pared celular (Hukin *et al.*, 2002).

Una reducción en el crecimiento causado por un cambio en la conductividad hidráulica se esperaría que produjera un mayor gradiente de potencial hídrico en la región afectada (Boyer, 1985). En raíces de maíz tratadas con Hg, durante los primeros 10 min del tratamiento el turgor se redujo en las células en crecimiento ubicadas entre los 5 y 7 mm del extremo apical de la raíz, causando una disminución en el potencial hídrico pero sin cambios en la presión osmótica. En contraste, no se reportaron cambios en el potencial hídrico de las células en crecimiento a 3 mm ni en células de la región de no crecimiento ubicada entre los 12 y 20 mm. Se desconoce si la correlación existente entre la conductividad hidráulica y el crecimiento es o no cuantitativa (Hukin *et al.*, 2002).

Mediante el análisis de RT-PCR, se encontró que existía un mayor nivel de expresión de los genes de las proteínas intrínsecas del plasmalema, ZmPiP1-2 y ZmPiP2-4 en las zonas jóvenes en crecimiento que en las zonas viejas y mucho mayor que en el ápice de la raíz. Sin embargo, el gen de la acuaporina del tonoplasto (ZmTIP1-1) mostró igual nivel de expresión en ambas regiones de la zona de crecimiento (Hukin *et al.*, 2002).

Por otro lado, al aplicar el compuesto fluorescente carboxifluoresceína, se demostró que existe conexión simplásmica entre el floema y las células corticales a 3mm de la punta de la raíz pero esto no se da en la raíz de los 5-20 mm de la punta. Esto es consistente con la disminución en la continuidad simplásmica a lo largo de la zona de crecimiento y evidencia un cambio en la vía principal del agua durante el desarrollo de la zona de crecimiento de las células radicales (Hukin *et al.*, 2002).

Barrowclough *et al.* (2000) demostraron que la sensibilidad de la conductividad hidráulica a Hg

cambia a lo largo de la raíz, sin embargo, la región en la que no se observan cambios significativos es la correspondiente a las células viejas y no a las jóvenes, contrario a lo que afirman Hukin *et al.* (2002). Esto parece aclararse al tener en cuenta que Barrowclough *et al.* (2000) denominaron como células jóvenes a las que se encuentran en la zona comprendida entre los 30 y 40 mm después de la punta de la raíz, mientras para Hukin *et al.* (2002) esta denominación se refiere a una zona entre 5 y 12 mm. Barrowclough *et al.* (2000) atribuyen este comportamiento a la formación de barreras endo y exodérmicas que previnieron la entrada de Hg al tejido. Sin embargo, según Zimmermann *et al.* (2000) tales barreras apoplásticas usualmente no se presentan en raíces de maíz en hidroponía, condición en la que se encontraban las plantas del estudio.

El incremento en la sensibilidad a Hg a lo largo de la zona de crecimiento radicular estuvo acompañado de cambios en la conexión simplástica de las células. Las células a 3 mm estuvieron asociadas a nivel de simplasto a través del perfil radial de la raíz. Esta conexión va disminuyendo a lo largo de la raíz y se observa que las células se aíslan a los 5 mm, mientras en células de mayor edad entre los 5 y 20 mm la fluorescencia estuvo confinada al floema. La disminución uniforme de la continuidad simplástica durante el desarrollo también se reportó en raíces de *A. thaliana* (Zhu *et al.*, 1998); en frijol se reportó que una conexión simplástica similar parece estar confinada a la región apical de la zona de elongación (Patrick y Offler, 1996). En raíces de maíz, la longitud de la zona donde predomina el transporte simplástico depende de la cantidad de solutos disponibles en la raíz y estuvo regulada aparentemente por la apertura y cierre de los plasmodesmata (Hukin *et al.*, 2002).

Lo anterior indica que las regiones donde la conductividad hidráulica es sensible a Hg coinciden con las regiones de aislamiento simplástico, sugiriendo que los sitios donde no existe la vía simplástica para la toma de agua, es necesario un

flujo de agua a través de las membranas y esto coincide con la presencia de acuaporinas funcionales en esta región (Hukin *et al.*, 2002).

El mercurio además de afectar el comportamiento de algunos canales hídricos también afecta la toma de nutrientes necesarios para el balance hídrico. Los altos niveles de Hg resultan en niveles más bajos de K, Mn y Mg tanto en raíces como en brotes, encontrándose también acumulaciones de Fe en los ápices radiculares. Los cambios promovidos por Hg son mayores en los ápices que en partes más viejas de las raíces. Por otro lado, se reporta un alto incremento de la toma de ^{45}Ca en presencia de HgCl_2 (Godbold, 1991), esto puede deberse a que el Hg es tomado en lugar de otros nutrientes (Patra *et al.*, 2004). Además se debe considerar el hecho que Hg denatura las proteínas reduciendo el funcionamiento de algunas enzimas y de transportadores de P y K (Patra *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2005; Moreno-Jimenez *et al.*, 2007).

Acuaporinas en las hojas y su influencia sobre los movimientos estomáticos

El Hg, al igual que otros MP, afecta notablemente los movimientos estomáticos a concentraciones submilimolares, probablemente de diferentes formas. El cloruro de lantano LaCl_3 , que bloquea los canales de calcio, aparentemente afecta los cambios en las concentraciones del Ca citosólico en las células guarda, lo cual influye indirectamente en la actividad de otros canales iónicos, tales como los canales de K, Cl y malato y finalmente la apertura y cierre estomático (Yang *et al.*, 2002).

La inhibición del flujo de agua a través de los canales por las bajas concentraciones de Hg reactivo se ha evaluado en muchos experimentos (Yang *et al.*, 2004; Clarkson *et al.*, 2000; Daniels *et al.*, 1996). En cortes de epidermis abaxial de *Vicia faba* L., cv. Dabaican incubados con diferentes concentraciones de HgCl_2 , ZnCl_2 , PbCl_2 , LaCl_3 , KCl, NaCl, y MgCl_2 se encontró que el

HgCl₂ afectó el movimiento estomático principalmente por el bloqueo de los canales de agua, presentándose diferencias significativas en el movimiento estomático en las plantas sometidas a este tratamiento, al igual que en las tratadas con LaCl₃. Lo anterior puede ser explicado teniendo en cuenta que el HgCl₂ inhibe los canales de agua en hojas de *Vicia faba* (Huang *et al.*, 2002; Yang, 2002). Los efectos principales causados por concentraciones altas de HgCl₂ han sido interpretados como toxicidad por Hg, pero las bajas concentraciones pueden causar efectos directos o indirectos sobre los canales de agua (Lu y Neumann, 1999; Yang *et al.*, 2002, 2004). Algunos investigadores consideran que el Hg puede alterar el metabolismo o causar la depolarización de la membrana, lo cual podría afectar de diferente forma los movimientos de las células guarda. Sin embargo, se ha encontrado que al aplicar mercaptoetanol, un agente reductor, se revierte la inhibición del movimiento estomático causada por HgCl₂. Adicional a esto, incluso cuando la duración de la exposición no fue muy larga el HgCl₂ produjo efectos leves sobre otros canales y enzimas (Yang *et al.*, 2004).

El efecto del HgCl₂ fue específico sobre los canales de agua, mientras que el LaCl₃ afectó la mayoría de canales iónicos en las membranas. Como resultado, el potencial osmótico y el potencial hídrico se vieron afectados en el interior y en el exterior de las células guarda, el flujo de agua fue limitado y el volumen de las células guarda no cambió. Con el tiempo, la inhibición de los movimientos estomáticos disminuyó tanto a plena luz como en oscuridad. Esto se debe a que el agua se mueve a través de la matriz lipídica de la membrana aun cuando los canales de agua estén inhibidos y el volumen de las células guarda se modificó y por tanto su apertura (Yang *et al.*, 2004).

La cantidad de estomas abiertos sobre el total nunca alcanzó una proporción de 1 o de 0 en el estudio realizado por Yang *et al.* (2004) donde tampoco se inhibieron los movimientos esto-

máticos completamente por los tratamientos de HgCl₂, LaCl₃ y HgCl₂ + LaCl₃. No todos los estomas estaban en el mismo estado, algunos aparecían abiertos, mientras otros permanecían cerrados. Las plantas pueden adaptarse a su ambiente o responder al estrés mediante la regulación celular de sus relaciones hídricas a través de los canales hídricos (López-Berenguer *et al.*, 2007; Netting, 2000 y Clarkson *et al.*, 2000).

Otros MP como el Pb y el Zn también causaron efectos significativos sobre el movimiento estomático y la inhibición fue más obvia a medida que aumentaba la concentración. La apertura estomática después de la incubación con Pb y Zn mostró un comportamiento similar al presentado después de la incubación con Hg, las hojas presentaron menor cantidad de estomas abiertos durante el día y mayor durante la noche, en comparación con los tratamientos con K, Na, Mg y el testigo. Los iones del Pb, el Zn y el Hg tienen diámetros atómicos y valencias similares y además comparten los mismos mecanismos para afectar los canales de agua (Yang *et al.*, 2004).

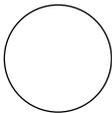
El efecto directo del Hg sobre los canales de transporte aumenta los efectos causados por la alta toxicidad del metal. En raíces, al igual que en hojas, la alta toxicidad de Hg se relaciona con la fuerte inhibición de los canales de agua por HgCl₂ que causan estrés hídrico, que puede ocasionar además un incremento en el estrés oxidativo inducido por Hg (Zhang y Tyerman, 1999).

CONCLUSIÓN

Existen numerosos factores abióticos que causan estrés hídrico en plantas, sin embargo las plantas han desarrollado estrategias para superar esta condición modificando los mecanismos de transporte de agua, tanto a nivel simplástico como apoplástico. Debido a que las acuaporinas son canales de agua que permiten el transporte eficiente de ésta a través de las membranas

evitando su paso a través del núcleo lipídico, cualquier factor que afecte su funcionamiento modifica el estatus hídrico de la planta. El Hg y algunos otros MP pueden inhibir a las acuaporinas y de esta manera disminuir la capacidad de respuesta de la planta ante una condición de déficit hídrico. Además, este elemento afecta la morfología de las raíces y el número de estomas en las hojas lo cual modifica la relación entre la toma de agua y su pérdida por el proceso de transpiración. El problema actual de disponibilidad de aguas de calidad para riego hace frecuente el uso de aguas con alto contenido de MP, incluido el Hg. La presencia de Hg en la planta, aún en bajas concentraciones, afecta directamente el funcionamiento de las acuaporinas, además de afectar varios procesos metabólicos. Dado su

efecto, es importante tener claro el papel del Hg ya que como resultado del cambio climático, que ya ha comenzado a afectar de manera directa la producción vegetal, las plantas tienen que desarrollarse bajo condiciones limitadas de agua y, por tanto, necesitan mejorar los mecanismos de transporte de esta. De otro lado, el Hg dada su capacidad de inhibir a las acuaporinas, ha sido una herramienta valiosa en la caracterización de la función e importancia de estas como transportadoras de agua bajo diferentes condiciones, incluidas las ocasionadas por el estrés abiótico. Esta caracterización ha permitido determinar que la manipulación genética de las acuaporinas es un mecanismo para obtener plantas con un uso más eficiente del agua y una mejor respuesta a condiciones de déficit hídrico.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandersson, E.; L. Frayse; S. Sjøvall-Larsen; S. Gustavsson; M. Fellert; M. Karlsson; U. Johanson y P. Kjellbom. 2005. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol. Biol.* 59, 469-484.
- Allen, G.J.; S.P. Chu; C.L. Harrington; K. Schumacher; T. Hoffmann; Y.Y. Tang; E. Gill y J.I. Schroeder. 2001. A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411, 1053-1057.
- Annon, D.I. y P.R. Stout. 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiol.* 14, 371-375.
- Barrowclough D.E.; C.A. Peterson y E. Steudle. 2000. Radial hydraulic conductivity along developing onion roots. *J. Exp. Bot.* 344, 547-557.
- Boyer, J.S. 1985. Water transport. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36, 473-516
- Bramley, H.; N.C. Turner; D.W. Turner y S.D. Tyerman. 2009. Roles of morphology, anatomy, and aquaporins in determining contrasting hydraulic behavior of roots. *Plant Physiol.* 150, 348-364.
- Bramley, H.; D.W. Turner; S.D. Tyerman y N.C. Turner. 2007. Water flow in the roots of crop species: the influence of root structure, aquaporin activity, and waterlogging. *Adv. Agron.* 96, 133-196
- Burzynski, M. y A. Zurek. 2007. Effects of copper and cadmium on photosynthesis in cucumber cotyledons. *Photosynthetica* 45, 239-244.
- Chaumont, E.; M. Moshelion y M.J. Daniels. 2005. Regulation of plant aquaporin activity. *Biol. Cell.* 97(10), 749-764.
- Cho, U. y J. Park. 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Sci.* 156, 1-9.
- Chrispeels, M.J. y C. Maurel. 1994. Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells. *Plant Physiol.* 105, 9-13.
- Clarkson, D.T.; M. Carvajal; T. Henzler; R.N. Waterhouse; A.J. Smyth; D.T. Cooke y E. Steudle. 2000. Root hydraulic conductance: Diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *J. Exp. Bot.* 51, 61-70.
- Daniels, M.J.; F. Chaumont; T.E. Mirkov y M.J. Chrispeels. 1996. Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *Plant Cell* 8, 587-599.
- Dixit, V.; V. Pandey y R. Shyam. 2000. Differential anti-oxidative responses to cadmium in roots and leaves

- of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). J. Exp. Bot. 52, 1101-1109.
- Du, X.; Y.G. Zhu; W.J. Liu y X.S. Zhao. 2005. Uptake of mercury (Hg) by seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture and interactions with arsenate uptake. Environ. Exp. Bot. 54, 1-7.
- Ehlert, C.; C. Maurel; F. Tardieu y T. Simonneau. 2009. Aquaporin-mediated reduction in maize root hydraulic conductivity impacts cell turgor and leaf elongation even without changing transpiration. Plant Physiol. 150, 1093-1104.
- Endeward, V.; R. Musa-Aziz; G.J. Cooper; L.M. Chen; M.F. Pelletier; L.V. Virkki; C.T. Supuran, L.S. King, W. F. Boron y G. Gros. 2006. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane. FASEB J. 20, 1974-1981.
- Echeverría, M. y R. Zardoya. 2006. Acuaporinas: los canales de agua celulares. Investig. Ciencia 363, 60-67.
- Fusconi, A.; O. Repetto; E. Bona; N. Massa; C. Gallo; E. Dumas-Gaudot y G. Berta. 2006. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. Environ. Exp. Bot. 58, 253-260.
- Gerbeau, P.; G. Amodeo; T. Henzler; V. Santoni; P. Ripoche y C. Maurel. 2002. The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. Plant J. 30, 71-81.
- Gerbeau, P.; J. Guclu; P. Ripoche y C. Maurel. 1999. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. Plant J. 18, 577-587.
- Godbold, D.L. 1991. Mercury-induced root damage in spruce seedlings. Water Air Soil Pollut. 56, 1.
- Gupta A.K. y S. Sinha. 2009. Antioxidant response in sesame plants grown on industrially contaminated soil: Effect on oil yield and tolerance to lipid peroxidation. Bioresour. Technol. 100, 179-185.
- Hachez, C.; M. Moshelion; E. Zelazny; D. Cavez y F. Chaumont. 2006. Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. Plant Mol. Biol. 62, 305-323.
- Hao, F.; X. Wang y J. Chen. 2006. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. Plant Sci. 170, 151-158.
- Hernández, L.E. y D.T. Cooke. 1997. Modification of the root plasma membrane lipid composition of cadmium-treated *Pisum sativum*. J. Exp. Bot. 48, 1375-1381.
- Huang, R.F.; M.J. Zhu; Y. Kang; J. Chen y X.C. Wang. 2002. Identification of plasma membrane aquaporin in guard cells of *Vicia faba* and its role in stomatal movement. Acta Bot. Sinica. 44, 42-48.
- Hukin, D.; C. Doering-Saad; C.R. Thomas y J. Pritchard. 2002. Sensitivity of cell hydraulic conductivity to mercury is coincident with symplasmic isolation and expression of plasmalemma aquaporin genes in growing maize roots. Planta 215, 1047-1056.
- Ionenko, I.F.; A.V. Anisimov y E.G. Karimova. 2006. Water transport in maize roots under the influence of mercuric chloride and water stress: a role of water channels. Biol. Plant. 50, 74-80.
- Ishikawa, F.; S. Suga; T. Uemura; M.H. Sato y M. Maeshima. 2005. Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 579, 5814-5820.
- Jang, J.; S. Lee; J. Rhee; G. Chung; S. Ahn y H. Kang. 2007. Transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses. Plant Mol. Biol. 64, 621-632.
- Jang, J.Y.; D.G. Kim; Y.O. Kim; J.S. Kim y H. Kang. 2004. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 54, 713-725.
- Javot, H. y C. Maurel. 2002. The role of aquaporins in root water uptake. Ann. Bot. 90, 301-313.
- Kaldenhoff, R.; K. Grote; J.J. Zhu y U. Zimmermann. 1998. Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 14, 121-128.
- Kobae, Y.; M. Mizutani; S. Segami y M. Maeshima. 2006. Immunochemical analysis of aquaporin isoforms in *Arabidopsis* suspension-cultured cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 980-987.
- López-Berenguer, C.; M. Martínez-Ballesta; C. García-Viguera y M. Carvajal. 2007. Leaf water balance mediated by aquaporins under salt stress and associated glucosinolate synthesis in broccoli. Plant Sci. 174, 321-328.
- Lu, Z. y P.M. Neumann. 1999. Water stress inhibits hydraulic conductance and leaf growth in rice seedlings but not the transport of water via mercury-sensitive water channels in the root. Plant Physiol. 120, 143-151.
- Maathuis, F.J.; V. Filatov; P. Herzyk; G.C. Krijger; K.B. Axelsen; S. Chen; B.J. Green; Y. Li; K.L. Madagan; R. Sánchez-Fernández; B.G. Forde; M.G. Palmgren; P.A. Rea; L.E. Williams; D. Sanders y A. Amtmann. 2003. Transcriptome analysis of root transporters

- reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *Plant J.* 35, 675-692.
- Martre, P.; R. Morillon; F. Barrieu; G.B. North; P.S. Nobel y M.J. Chrispeels. 2002. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol.* 130, 2101-2110.
- Maurel, C. 2007. Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Letters* 581, 2227-2236.
- Maurel, C.; L. Verdoucq; D.T. Luu y V. Santoni. 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 595-624.
- Mendelsohn, I.A.; K.L. McKee y T. Kong. 2001. A comparison of physiological indicators of sublethal cadmium stress in wetland plants. *Environ. Exp. Bot.* 46, 263-275.
- Miranda, D.; C. Carranza y G. Fischer. 2008. Calidad del agua de riego en la Sabana de Bogotá. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Morel, M.; J. Crouzet; A. Grivot; P. Auroy; N. Leonhardt; A. Vavasseur y P. Richaud. 2009. AtHMA3, a P_{1B}-ATPase Allowing Cd/Zn/Co/Pb Vacuolar Storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149, 894-904.
- Moreno-Jimenez, E.; J.M. Penalosa; E. Esteban y R.O. Carpena-Ruiz. 2007. Mercury accumulation and resistance to mercury stress in *Rumex induratus* and *Marrubium vulgare* grown in perlite. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170, 485-494.
- Netting, A.G. 2000. pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions: cellular responses to stress and their implication for plant water relations. *J. Exp. Bot.* 51, 147-158.
- Ortega-Villasante, C.; R. Rellán-Álvarez; F.F. DelCampo; R.O. Carpena-Ruiz y L.E. Hernández. 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J. Exp. Bot.* 56, 2239-2251.
- Patra, M.; N. Bhowmik; B. Bandopadhyay y A. Sharma. 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plants systems and the development of genetic tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 52, 199-223.
- Patrick, J.W. y C.E. Offler. 1996. Post-sieve element transport of photoassimilates in sink regions. *J. Exp. Bot.* 47, 1165-1177.
- Peralta-Videa, J.R.; M.L. Lopez; M. Narayan; G. Saupe y J. Gardea-Torresdey. 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1665-1677.
- Perfus-Barbeoch, L.; N. Leonhardt; A. Vavasseur y C. Forestier. 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.* 32(4), 539-548.
- Poschenrieder, C. y J. Barceló. 2004. Water relations in heavy metal stressed plants. pp. 249-263. En: Prasad, M. (ed.). *Heavy metal stress in plants from biomolecules to ecosystems*. 2a ed. Springer-Verlag, New York, NY.
- Quigley, F.; J.M. Rosenberg; Y. Shachar-Hill y H.J. Bohnert. 2001. From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol.* 3, 1-17.
- Romero-Puertas, M.C.; M. Rodríguez-Serrano; F.J. Corpas y L.A. del Río. 2004. Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂•⁻ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant Cell Environ.* 27, 1122-1134.
- Ryser, P. y P. Emerson. 2007. Growth, root and leaf structure, and biomass allocation in *Leucanthemum vulgare* Lam. (Asteraceae) as influenced by heavy-metal-containing slag. *Plant Soil* 59, 2461-2467.
- Sakurai, J.; F. Ishikawa; T. Yamaguchi; M. Uemura y M. Maeshima. 2005. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol.* 46, 1568-1577.
- Santala, K.R. y P. Ryser. 2009. Influence of heavy-metal contamination on plant response to water availability in white birch, *Betula papyrifera*. *Environ. Exp. Bot.* 66, 334-340.
- Santoni, V.; L. Verdoucq; N. Sommerer; J. Vinh; D. Pflieger y C. Maurel. 2006. Methylation of aquaporins in plant plasma membrane. *Biochem. J.* 400, 189-197.
- Schroeder, J.I.; G.J. Allen; V. Hugouvieux; J.M. Kwak y D. Waner. 2001. Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 627-658.
- Shaw, B.P.; S.K. Sahu y R.K. Mishra. 2004. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: Prasad, M. (ed.). *Heavy metal stress in plants from biomolecules to ecosystems*, second edition. Springer-Verlag, New York, NY.
- Siefritz, F.; M.T. Tyree; C. Lovisolo; A. Schubert y R. Kaldenhoff. 2002. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* 14, 869-876.
- Singh, S. y S. Sinha. 2004. Scanning electron microscopic studies and growth response of the plants of *Helianthus annuus* L. grown on tannery sludge amended soil. *Environ. Int.* 30, 389-395.
- Sun, M.H.; W. Xu; Y.F. Zhu; W. Su y Z.C. Tang. 2001. A simple method for *in situ* hybridization to RNA in guard cells of *Vicia faba* L.: The expression of aquaporins in guard cells. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19, 129-135.

- Tamás, L.; B. Bocová; J. Huttová; I. Mistrík y M. Ollé. 2006. Cadmium induced inhibition of apoplastic ascorbate oxidase in barley roots. *Plant Growth Regul.* 48, 41-49.
- Tamás, L.; J. Dudíková; K. Durceková; J. Huttová; I. Mistrík y V. Zelinová. 2008. The impact of heavy metals on the activity of some enzymes along the barley root. *Environ. Exp. Bot.* 62, 86-91.
- Vander Willigen, C.; O. Postaire; C. Tournaire-Roux; Y. Boursiac y C. Maurel. 2006. Expression and inhibition of aquaporins in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell Physiol.* 47, 1241-1250.
- Yang, H.M.; X.Y. Zhang y G.X. Wang. 2004. Effects of heavy metals on stomatal movements in broad bean leaves. *Russ. J. Plant Physiol.* 51(4), 464-468.
- Yang, H.M.; Y. Li y G.X. Wang. 2002. Functions and roles of the channels in broad bean stomatal movements. *Acta Phytoecol. Sinica* 26, 656-660.
- Yu, Q.; Y. Hu; J. Li; Q. Wu y Z. Lin. 2005. Sense and antisense expression of plasma membrane aquaporin BnPIP1 from *Brassica napus* in tobacco and its effects on plant drought resistance. *Plant Sci.* 169, 647-656.
- Yukutake, Y.; S. Tsuji; Y. Hirano; T. Adachi; T. Takahashi; K. Fujihara; P. Agre; M. Yasui y M. Suematsu. 2008. Mercury chloride decreases the water permeability of aquaporin-4-reconstituted proteoliposomes. *Biol. Cell.* 100(6), 355-363.
- Zhang, W. y S.D. Tyerman. 1999. Inhibition of water channels by HgCl₂ in intact wheat root cells. *Plant Physiol.* 120, 849-857.
- Zhang, Y.; Z. Wang; T. Chai; Z. Wen y H. Zhang. 2008. Indian mustard aquaporin improves drought and heavy-metal resistance in tobacco. *Mol. Biotechnol.* 40, 280-292.
- Zhang, Z.Q.; W.S. Shu; C.Y. Lan y M.H. Wong. 2001. Uptake and translocation of heavy metals in dominant plants of soil seed banks introduced to a lead/zinc mine tailings pond. *Acta Phytoecol. Sinica* 25, 306-311.
- Zhu, T.; R.L. O'Quinn; W.J. Lucas y T.L. Rost. 1998. Directional cell to cell communication in the *Arabidopsis* root apical meristem. II. Dynamics of plasmodesmata formation. *Protoplasma* 204, 84-93.
- Zimmermann, H.M.; K. Hartmann; L. Schreiber y E. Steudle. 2000. Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* 210, 302-311.